

УДК 664.579.674

DOI: 10.15587/1729-4061.2019.160142

Моделювання процесу формування мікробних біоплівок на нержавіючій сталі з різною шорсткістю поверхні

М. Д. Кухтин, Х. Ю. Кравченко, Л. А. Бейко, Ю. В. Горюк, О. І. Скляр,
С. П. Керничний

Наведено дослідження процесу адгезії бактерій до поверхні з різною шорсткістю залежно від розмірів і форми. Встановлено, що на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю $2,687 \pm 0,014$ мкм, процес плівкоутворення у *E. coli* та *S. aureus* проходив однаково упродовж з 3 до 24 години та не залежав від розмірів бактерій. Це дозволяє стверджувати, що паличковидні і кокові бактерії вільно прикріплюються у западинах шорсткості та розпочинається початковий процес першої стадії формування біоплівки. Під час санітарної обробки у западинах шорсткості можуть залишатися, як кокові, так паличковидні бактерії. На поверхні сталі з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мкм процес плівкоутворення у *S. aureus* проходив інтенсивніше, ніж у *E. coli*. Упродовж 3 год інкубації щільність сформованих біоплівки *S. aureus* була в 1,2 раза більша, порівняно з біоплівками *E. coli*. У наступні 15 годин інкубації сформовані біоплівки *S. aureus* були, в середньому в 1,3 раза щільніші. Це дає підставу вважати, що *S. aureus* завдяки кулястій формі здатний розміщуватися у западинах шорсткості $0,95 \pm 0,092$ мкм і швидше адгезуватися до поверхні. Водночас *E. coli*, завдяки паличковидній формі, за такої шорсткості поверхні може адгезуватися у западини тільки повздовж. Доведено, що за шорсткості поверхні $0,63 \pm 0,087$ мкм інтенсивність плівкоутворення *S. aureus* була, в середньому в 1,4 раза швидша, ніж у *E. coli*. Водночас, за шорсткості $0,16 \pm 0,018$ мкм процес плівкоутворення проходив однаково у *S. aureus* і *E. coli*, але біоплівки були нижчої щільності, порівняно з такими, які формувалися за шорсткості $0,63 \pm 0,087$ мкм.

Отже, використання обладнання у молочній промисловості з шорсткістю менше 0,5 мкм дозволить зменшення прикріплення мікроорганізмів до поверхні і зниження контамінації молочних продуктів

Ключові слова: мікробна адгезія, формування біоплівки, шорсткість поверхні нержавіючої сталі, процес плівкоутворення

1. Вступ

Наявність бактерій на поверхнях технологічного обладнання в молочній промисловості розглядається як важливий чинник, який може призвести до забруднення молочних продуктів і вважається важливою гігієнічною проблемою [1]. Водночас, мікроорганізми виживають на поверхнях технологічного обладнання завдяки здатності формувати біоплівкові форми [2, 3]. У зв'язку з цим до поверхні технологічного обладнання, яке використовується в молочній промисловості, ставляться певні гігієнічні вимоги, особливо щодо марки сталі, рельєфу

та шорсткості. Згідно Директиви ЄС 93/43 [4, 5], за критеріями оцінки гігієнічності обладнання великі ділянки поверхні, які контактують з продуктом, повинні мати шорсткість, що не перевищує 0,8 мкм. Це обумовлене тим, що шорсткість поверхні може сприяти або перешкоджати адгезії і розмноженню біоплівкових форм бактерій [6, 7]. Крім того, розвиток біоплівки сприяє зниженню ефективності санітарної обробки молочного обладнання і тим самим підвищує мікробне забруднення молочних продуктів та скорочує терміни їх придатності.

Отже, проведення досліджень з вивчення процесу формування біоплівок бактеріями, які мають різні форми і розміри, залежно від шорсткості поверхні нержавіючої сталі, є актуальними у молочній промисловості. Дослідження у такому напрямку дозволять науково обґрунтувати параметри шорсткості поверхні молочного обладнання, які б максимально знижували процес мікробної адгезії. Такі дослідження можуть стати підґрунтям для розробки способу оцінки нержавіючої сталі на наявність протиадгезивних властивостей.

2. Аналіз літературних даних і постановка проблеми

Успішний розвиток мікробних біоплівок не можливий без адгезії мікроорганізму до поверхні. Вчені виділяють п'ять основних стадій формування і розвитку біоплівок на будь якій поверхні [8]. На рис. 1 наведено схематичну модель формування і росту біоплівки.



Рис. 1. Гіпотетична модель формування мікробної біоплівки

Стадія 1 – це адгезія бактерій до поверхні; 2–4 стадія – ріст колоній і продукування міжклітинного матриксу, формування біоплівки; 5 – дисперсія (вихід планктонних бактерій із біоплівки). Мікроорганізми, які розташовані у верхньому шарі матриксу біоплівки, розмножуються, вивільняють планктонні клітини, які колонізують інші поверхні [9]. Проте, процес формування кожної біоплівки має певні особливості, які регулюються генетичними, біохімічними властивостями бактеріальної клітини та чинниками навколишнього середовища [10]. Отже, біоплівка – це мікробне угруповання, яке формується з клітин, прикріплених до поверхні або одна до одної, знаходячись в матриксі синтезованих позаклітинних речовин [11, 12]. Основна небезпека від біоплівок на молочному обладнанні полягає в тому, що позаклітинний матрикс біоплівки захищає бакте-

рії від дії дезінфікуючих засобів. Мікроорганізми, які вижили, колонізують нові поверхні та молочні продукти [1, 3].

Вважається, що адгезія бактерій до поверхні – це складний фізико-хімічний процес, який залежить від: властивостей поверхні (топографія, шорсткість, гідрофобність, хімічний склад, поверхнева енергія) [13, 14]. Також він залежить від початкової кількості мікроорганізмів їх форми, розмірів, температури і рН навколишнього середовища тощо [15, 16]. Тому під час вивчення процесу мікробної адгезії і формування біоплівки у лабораторних умовах не завжди вдається врахувати вплив виробничих факторів і фізіологічних особливостей мікробних клітин.

Проте, серед багатьох наведених чинників, які впливають на процес адгезії, дослідники виокремлюють роль властивостей поверхні, що визначається як найбільш сутєва [17, 18]. Внаслідок цього було запропоновано три теорії мікробної адгезії до поверхні: термодинамічна, DLVO теорія та XDLVO [13]. Термодинамічна теорія ґрунтується на тому, що при прикріпленні мікроорганізмів до поверхні відбувається зміна загальної вільної енергії Гіббса, сил Ван дер Ваальса. Теорія DLVO базується на тому, що колоїдні частинки ліофобної дисперсної системи можуть безперешкодно зближуватися одна з одною, доки не відбудеться контакт їхніх рідких дифузних оболонок. Теорія XDLVO ґрунтується на термодинамічній і DLVO теорії [13]. Проте дослідники вважають, що всі три теоретичні моделі, які мають на меті розкрити суть мікробної адгезії до поверхні, розроблені для ідеальної колоїдної системи. У виробничих умовах мікробна адгезія – це набагато складніший процес і прикріплення мікроорганізмів може відбуватися по-різному [19, 20].

У молочній промисловості найчастіше використовують для обладнання і устаткування нержавіючі корозійно-стійкі сталі наступних марок AISI-304, AISI-316, AISI-321 [21]. Дані сталі в стані поставки можуть мати різну шорсткість поверхні 0,2–3,2 мкм [22]. Дослідження з вивчення впливу рельєфу та шорсткості поверхні на мікробну адгезію досить не однозначні. Так, згідно даних досліджень [23, 24] існує кореляція між шорсткістю поверхні та бактеріальною адгезією, причому прикріплення мікроорганізмів до поверхні збільшувалося із зростанням шорсткості. Повідомляється [17, 25], що формування біоплівки проходило набагато повільніше на поверхні з шорсткістю до 0,4 мкм, порівняно з шорсткістю більшою 0,8 мкм. За допомогою електронної мікроскопії дослідники [7, 26] виявили, що первинна адгезія мікробних клітин відбувається вздовж западин шорсткості поверхні, оскільки за таких умов збільшується площа контакту мікробної клітини з поверхнею. Проте, інші дослідження вказують [27, 28], що між шорсткістю поверхні нержавіючої сталі та мікробною адгезією практично відсутній кореляційний зв'язок. Також повідомляються різні дані про вплив змочуваності поверхні на мікробну адгезію. Виявлено, що кількість адгезованих бактерій знижувалася з підвищенням поверхневої гідрофобності, а мікроорганізми, які прикріплювалися до гідрофобних поверхонь, легше видалялися за рахунок збільшення сили потоку під час циркуляції рідини [29–31]. Проте, інші дослідники [32], вказують, що між поверхневою змочуваністю та мікробною адгезією відсутній кореляційний зв'язок. Також виявлено, що

сформовані біоплівки на поверхнях з великою шорсткістю знижували ефективність теплопередачі у теплообмінниках-конденсатору, приблизно на 15 % [17].

Таким чином, аналіз літературних джерел виявив, що гігієнічна якість і чистота технологічного обладнання у молочній промисловості після санітарної обробки може бути тісно пов'язана із рельєфом і шорсткістю. Тому проведення досліджень з вивчення процесу плівкоутворення на нержавіючій сталі з різною шорсткістю упродовж певного часу та з використанням різних форм і розмірів бактерій є перспективними. Дані дослідження дозволять глибше зрозуміти процес формування мікрофлори на обладнанні і відповідно контамінацію харчових продуктів. Також з'ясування впливу шорсткості поверхні на мікробну адгезію сприятиме удосконаленню та модифікації поверхонь, які перешкоджають адгезії.

3. Ціль та задачі дослідження

Метою роботи було визначити вплив різної шорсткості поверхні нержавіючої сталі на процес мікробної адгезії і плівкоутворення, залежно від фізіологічних і морфологічних особливостей мікроорганізмів, які контамінують обладнання. Це дасть можливість обґрунтувати величину шорсткості поверхні молочного обладнання, яка б максимально знижувала процес мікробної адгезії та добре піддавалася санітарній обробці.

Для досягнення даної мети були поставлені такі завдання:

- експериментально дослідити процес плівкоутворення паличковидними та коковими формами бактерій на нержавіючій сталі з різною шорсткістю поверхні за температури 25 °C;
- теоретично змодельовати процес деградації біоплівок на нержавіючій сталі з різною шорсткістю поверхні під час санітарної обробки.

4. Матеріали і методи дослідження процесу плівкоутворення на

Більш детально досліджувані матеріали та обладнання, що використовувались в експерименті описані в [33].

Щільність сформованих мікробних біоплівок визначали наступним чином. У стерильні чашки Петрі ставили стерильні пластини з нержавіючої сталі з відповідною шорсткістю поверхні і вносили в чашку стерильний м'ясопептонний бульйон (МПБ) та тест-культуру *E. coli* або *S. aureus* з концентрацією, щоб на 1 см² площі пластини припадало, в середньому від 1 до 10 тис. клітин. Через 3, 6, 9, 12, 18 та 24 годин інкубації за температури 25 °C пластини витягували з чашок Петрі, триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером та фіксували утворені біоплівки 96° етиловим спиртом. Після фіксування біоплівки фарбували у 0,1 % розчині кристалічного фіолетового та висушували. Потім кожну пластинку окремо заливали 7,0 см³ 96° етиловим спиртом та залишали на 10 хв. Після експозиції 10 хв. відбирали 5 см³ промивного розчину з біоплівок та визначали оптичну густину спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нМ.

За оптичної густини промивного розчину до 0,5 од. щільність сформованих біоплівок вважали низькою і вважали, що сталь проявляє відмінні протиадгезивні властивості; від 0,51 до 1,0 од. – середньою, добрі протиадгезивні властиво-

сті поверхні сталі; при густині розчину 1,01–1,30 од. щільність сформованих біоплівкок вважали високою і задовільні протиадгезивні властивості сталі; більше 1,31 – незадовільні протиадгезивні властивості сталі [1].

Електронно-мікроскопічні дослідження сформованих біоплівкок на нержавіючій сталі проводили на електронному растровому мікроскопі (РЕМ 106 И, Україна).

5. Результати досліджень формування біоплівкок та моделювання деградації за санітарної обробки

Попередніми дослідженнями встановлено, що з молочного обладнання та готової продукції на молокопереробних підприємствах виділяються бактерії родів *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* і родини *Enterobacteriaceae* [2]. Стафілококи відносяться до факультативно-анаеробних нерухомих, кокоподібної форми бактерій розміром 0,5×1,5 мкм. Кишкова паличка (*Escherichia coli*), рухома паличка, яка має здатність переміщатися за допомогою джгутиків, факультативний анаероб, розміром 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм [34].

На першому етапі досліджень визначали процес формування біоплівки *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю $2,687 \pm 0,014$ мкм (рис. 2).

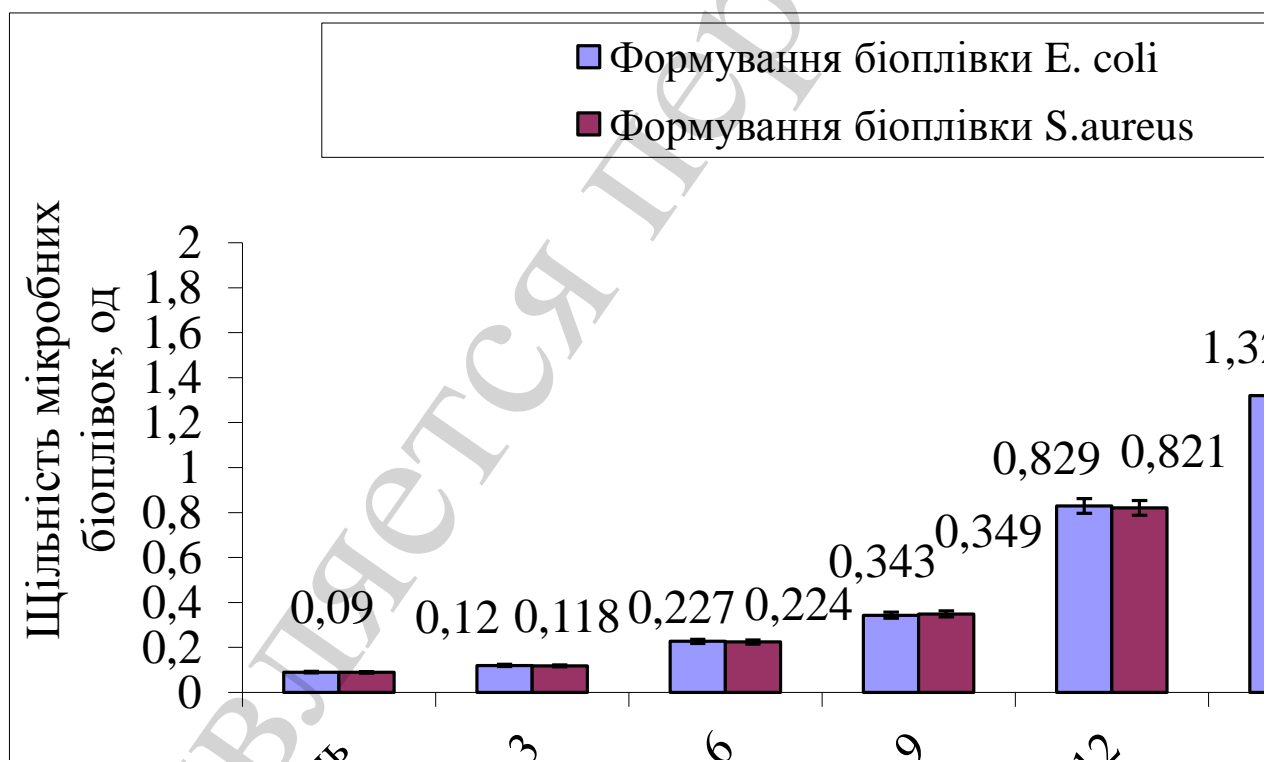


Рис. 2. Формування біоплівкок *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю $2,687 \pm 0,014$ мкм за температури 25 °C

З даних рис. 2 видно, що оптична щільність мікробних біоплівкок упродовж часу інкубації поступово зростала. Проте, процес плівкоутворення проходив практично однаково, як у *E. coli*, так і в *S. aureus* та не залежав від розмірів і форми ба-

ктерій. На основі отриманих даних на рис. 3 наведена схематична модель формування біоплівки даними бактеріями за шорсткості поверхні 3,00 мкм.

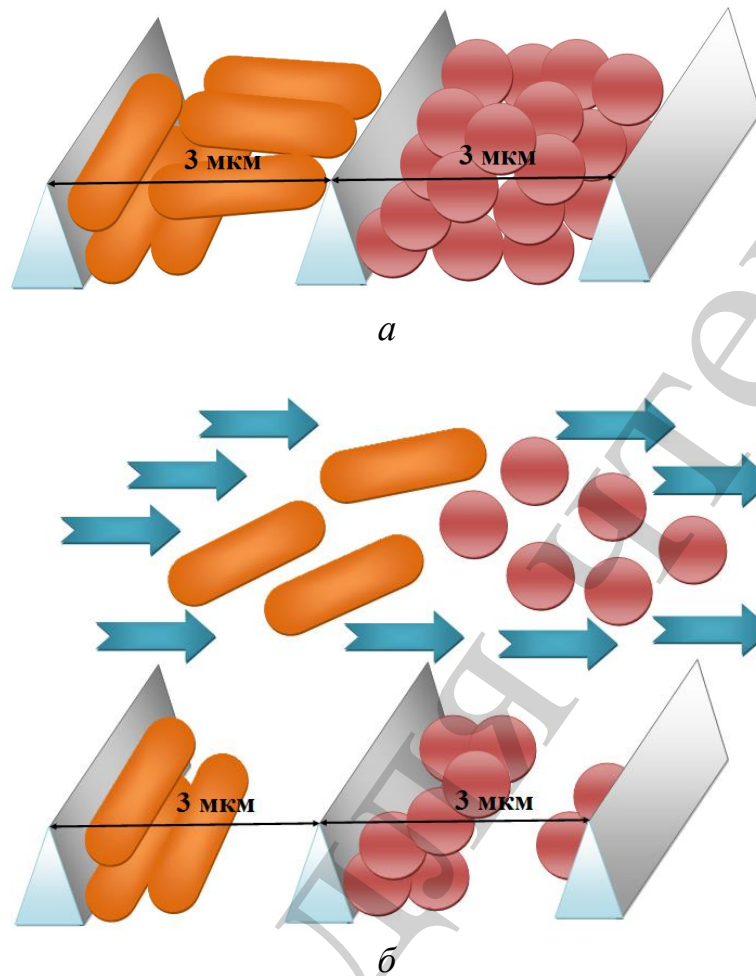


Рис. 3. Схематична модель формування і руйнування біоплівок паличковидними та коковими формами бактерій на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю 3,00 мкм: *а* – до санітарної обробки; *б* – під час санітарної обробки

Видно (рис. 3), що паличковидні і кокові форми бактерій вільно прикріплюються у западинах шорсткості, внаслідок чого за таких умов відбувається добра адгезія до поверхні і розпочинається початковий процес першої стадії формування біоплівки. Під час санітарної обробки у западинах шорсткості можуть залишатися як кокові, так паличковидні бактерії. Адже, клітини у сформованій біоплівці у западинах є захищені від дії мийних засобів.

Електронно-мікроскопічні дослідження процесу формування біоплівки паличковидними і коковими формами бактерій через 6 год інкубації наведено на рис. 4.

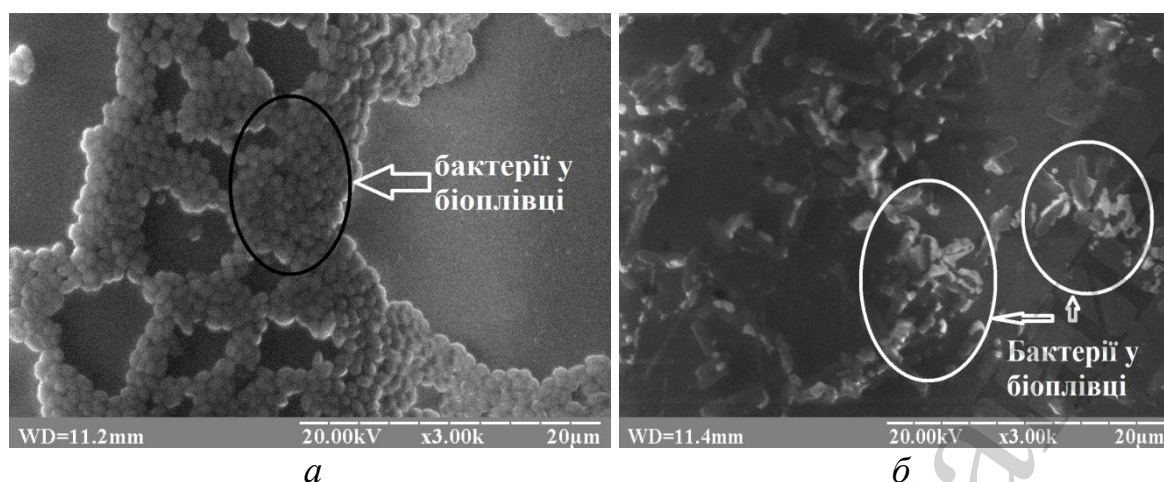


Рис. 4. Процес формування біоплівки мікроорганізмами через 6 год інкубації:
 а – коковими формами; б – паличковидними формами

З рис. 4 видно, що бактерії починають продукувати екзополісахаридний матрикс, який огортає клітини і захищає від шкідливих чинників навколишнього середовища. Крім того, через даний період часу виявляються ще поодинокі вільно розміщені на поверхні бактерії без біоплівки.

Отже, отримані дані вказують на те, що за шорсткості поверхні нержавіючої сталі $2,687 \pm 0,014$ мкм процес формування мікробних біоплівок паличковидними і коковими формами бактерій проходить рівномірно і не залежить від форми і розмірів бактерій.

На рис. 5 наведені результати досліджень процесу формування біоплівок *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мкм.

З даних рис. 5 видно, що процес плівкоутворення на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мкм у *S. aureus* проходить інтенсивніше, ніж у *E. coli*. Так, упродовж 3 год інкубації оптична щільність сформованих біоплівок *S. aureus* була в 1,2 раза більша, порівняно з щільністю біоплівок сформованих *E. coli*. Через 6 год інкубації за такої шорсткості, щільність біоплівок утворених *S. aureus* становила 0,289 од і була в 1,4 раза ($p < 0,05$) більша, ніж у *E. coli*. У подальші години інкубації щільність біоплівок поступово зростала, однак з 6 по 12 год біоплівки *S. aureus* виявилися, у середньому в 1,3 раза ($p < 0,05$) щільніші за біоплівки утворені *E. coli*. На 18 і 24 год інкубації різниця між щільністю біоплівками утвореними *S. aureus* і *E. coli* не перевищувала 1,1 раза. Це вказує на те, що до 18 год інкубації *E. coli* на нержавіючій сталі з шорсткістю 0,955 мкм формує біоплівки на виступах шорсткості.

Схематична модель формування біоплівки на нержавіючій сталі з шорсткістю 0,95 мкм наведена на рис. 6.

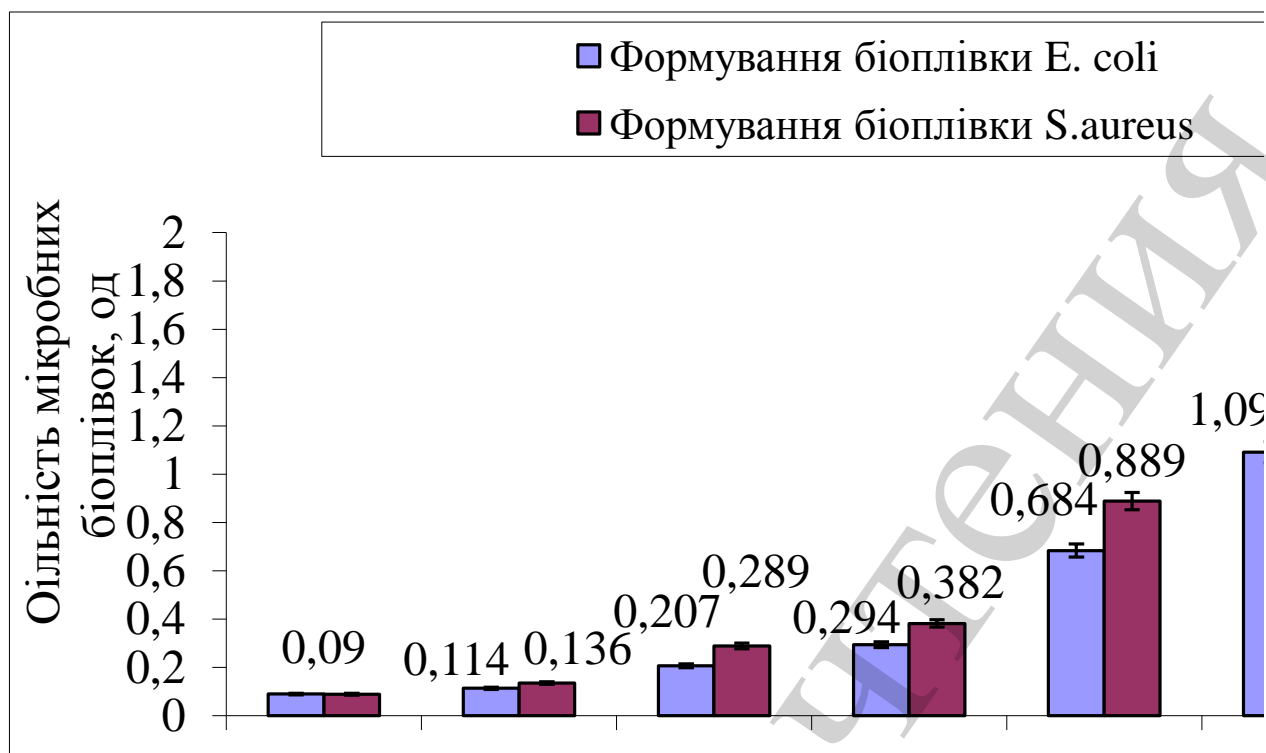


Рис. 5. Формування біоплівок *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мкм за температури 25 °С

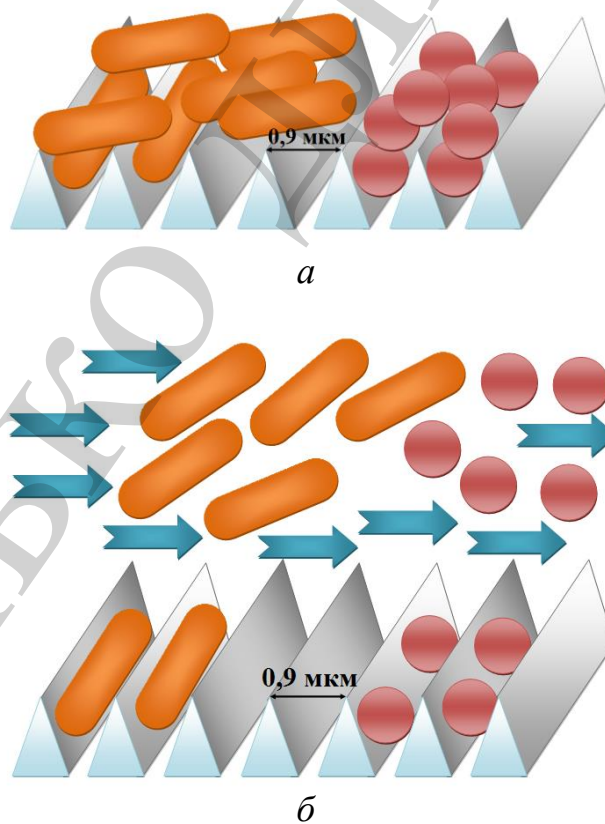


Рис. 6. Схематична модель формування і руйнування біоплівок паличковидними та коковими формами бактерій на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю 0,90 мкм: а – до санітарної обробки; б – під час санітарної обробки

З даних рис. 6 видно, що за такої шорсткості поверхні нержавіючої сталі кокові форми бактерій завдяки меншим розмірам поміщаються в западинах шорсткості, швидше адгезуються і формують біоплівку. Водночас, паличковидні форми бактерій, зокрема *E. coli*, завдяки більшим розмірам у западини шорсткості розміром в 1 мкм можуть прикріплюватися тільки повздовж. Внаслідок цього адгезія кишкової палички проходить повільніше і щільність біоплівок нижча. Санітарна обробка знищить біоплівки утворені на виступах шорсткості, а у западинах у більшій мірі виживуть біоплівки утворені коковими бактеріями.

На рис. 7 наведено результати дослідження формування біоплівок *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю $0,63 \pm 0,087$ мкм.

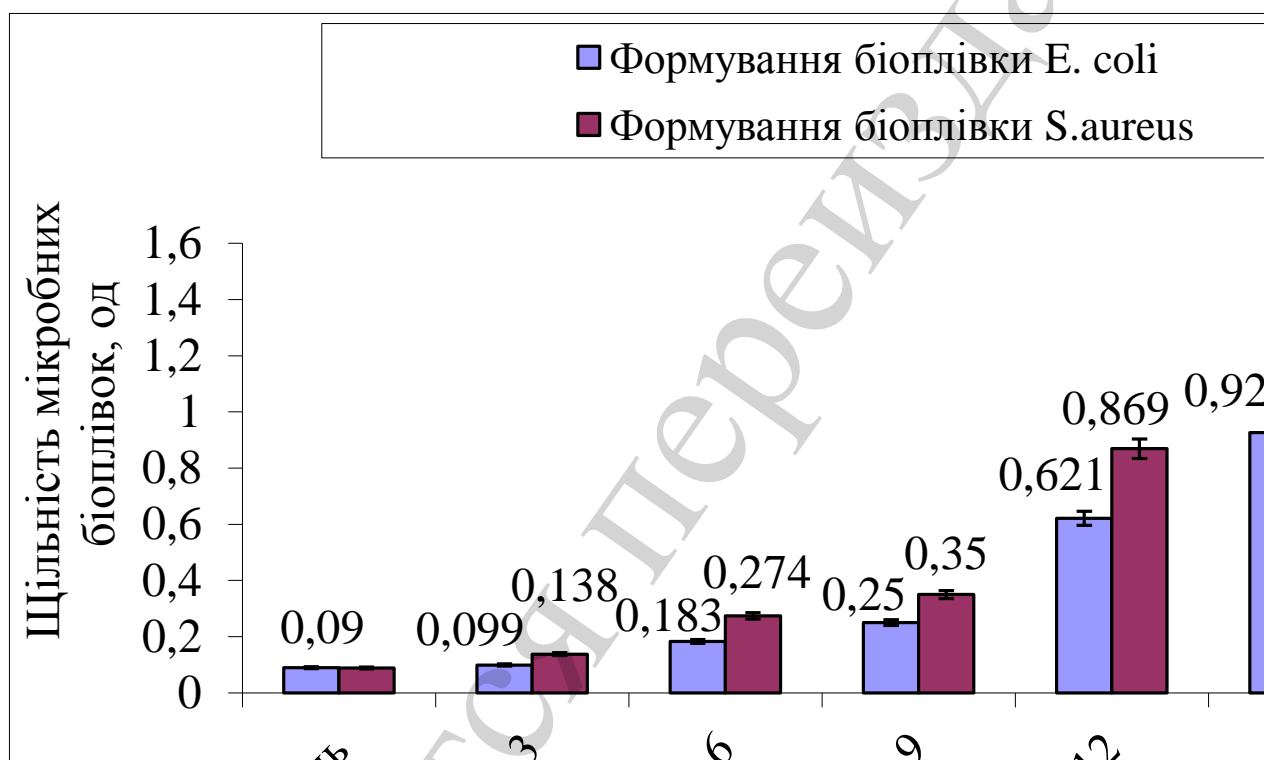


Рис. 7. Формування біоплівок *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю $0,63 \pm 0,087$ мкм за температури 25 °C

З даних рис. 7 видно, що оптична щільність біоплівок, сформованих *S. aureus* через 3 год інкубації, виявилася в 1,4 раза ($p < 0,05$) більшою, порівняно з біоплівкою утвореною *E. coli*. На 6 год інкубації інтенсивність плівкоутворення у *S. aureus* за такої шорсткості сталі була уже в 1,5 раза ($p < 0,05$) швидшою, ніж у *E. coli*. З 9 по 12 год інкубації тест-культур виявлено в середньому в 1,4 раза ($p < 0,05$) щільнішу біоплівку в *S. aureus*. На 18 год інкубації різниця між щільністю біоплівок сформованих *S. aureus* і *E. coli* знизилася до 1,2 раза, а за 24 год до 1,1 раза. Це вказує на те, що кишкова паличка упродовж цього часу добре адгезувалася на виступах шорсткості поверхні і розпочала інтенсивний процес плівкоутворення.

Схематична модель процесу плівкоутворення *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю 0,63 мкм наведена на рис. 8.

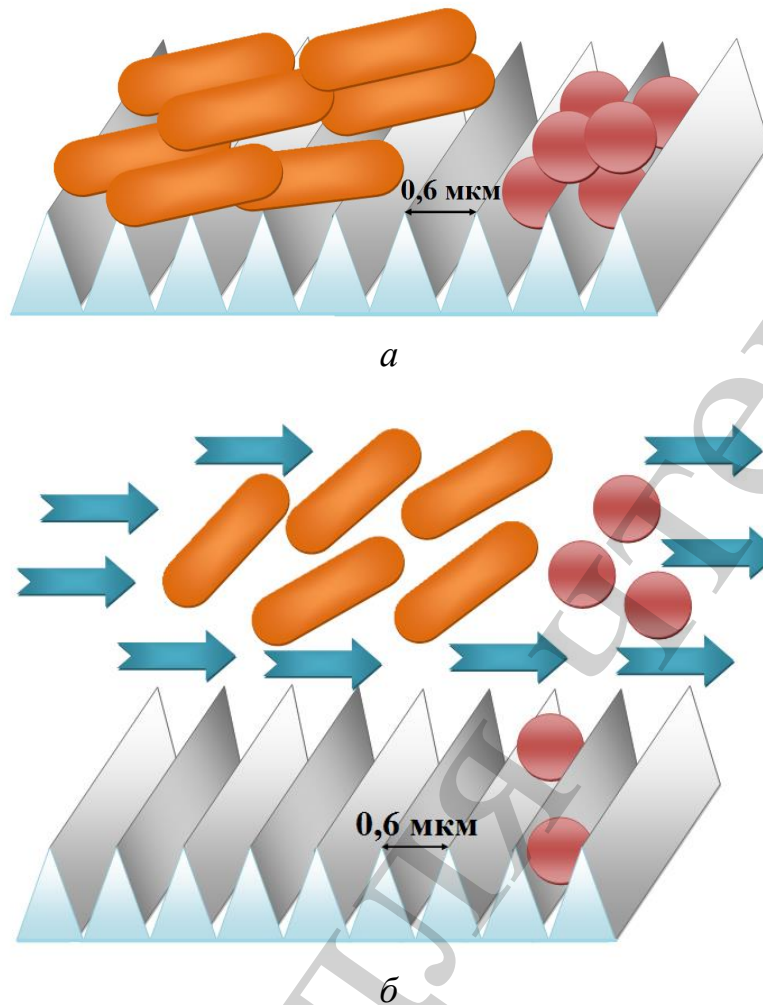


Рис. 8. Схематична модель формування і руйнування біоплівки паличковидними та коковими формами бактерій на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю 0,63 мкм: *а* – до санітарної обробки; *б* – під час санітарної обробки

Дані рис. 8 дають можливість припустити, що за шорсткості поверхні нержавіючої сталі 0,63 мкм паличковидні бактерії, зокрема *E. coli*, має змогу адгезуватися і розпочати процес формування біоплівки тільки на виступах не проникаючи у западини. У той же час, за такої шорсткості поверхні кокові бактерії розміром до 0,63 мкм здатні адгезуватися у западинах. Сформовані біоплівки у западинах шорсткості є щільніші і більш захищені від чинників навколишнього середовища, зокрема таких як санітарна обробка мийними і дезінфікуючими засобами у харчовій промисловості.

Також отримані результати досліджень вказують на те, що процес плівкоутворення на нержавіючій сталі з шорсткістю 0,63 мкм проходив повільніше у паличковидних і кокових бактерій, порівняно з шорсткістю поверхні 2,687 і 0,95 мкм.

На рис. 9 наведено дослідження формування біоплівки *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю $0,16 \pm 0,018$ мкм.

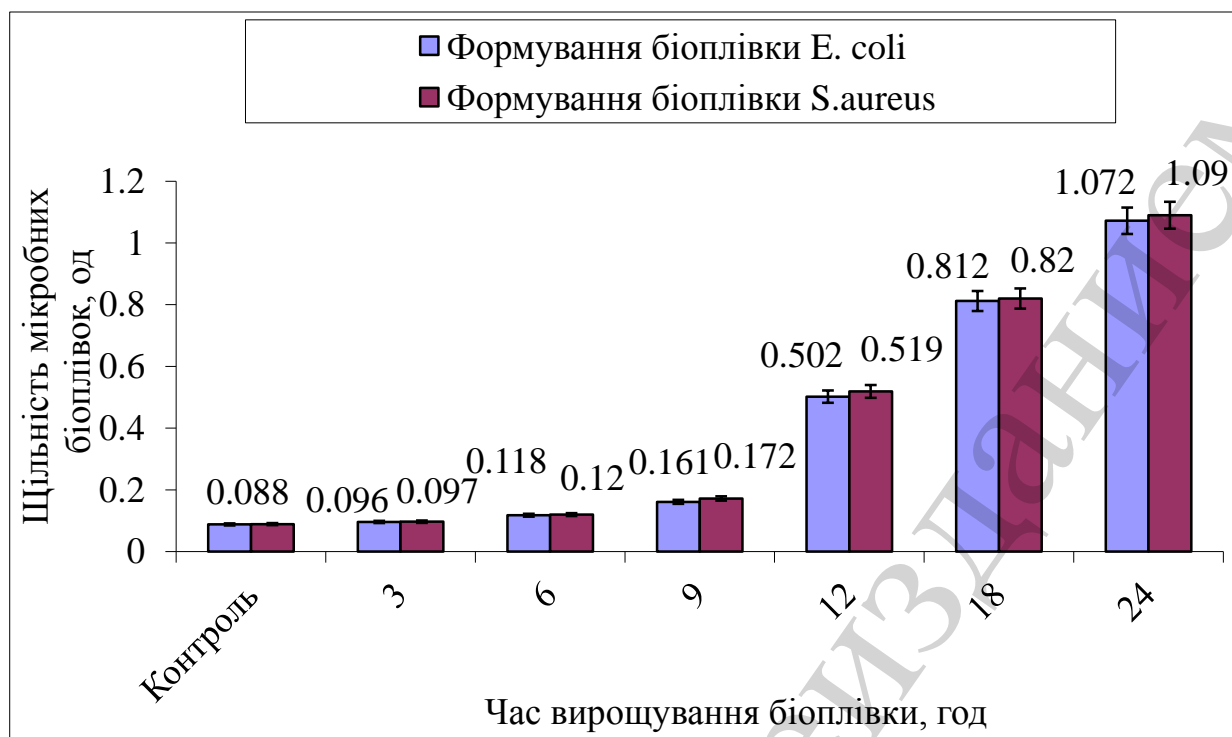


Рис. 9. Формування біоплівок *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю $0,16 \pm 0,018$ мкм

З даних рис. 9 видно, що за шорсткості поверхні сталі $0,16 \pm 0,018$ мкм вірогідної різниці в щільності сформованих біоплівок *E. coli* та *S. aureus* упродовж часу інкубації 24 год не виявлено. Це вказує на те, що процес адгезії і плівкоутворення проходить на виступах шорсткості, як у *E. coli*, так у *S. aureus*.

Схематична модель процесу плівкоутворення *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю 0,2 мкм наведена на рис. 10.

Схематична модель формування біоплівки за шорсткості 0,2 мкм виявила (рис. 10, а), що за таких розмірів бактерій адгезія можлива лише на виступах шорсткості. Водночас під час проведення санітарної обробки мийними і дезінфікуючими засобами (рис. 10, б) за такої шорсткості поверхні відбувається легка деградація біоплівки паличковидних і кокових форм бактерій, так як виступи шорсткості поверхні не захищають біоплівки і адгезивні сили руйнуються.

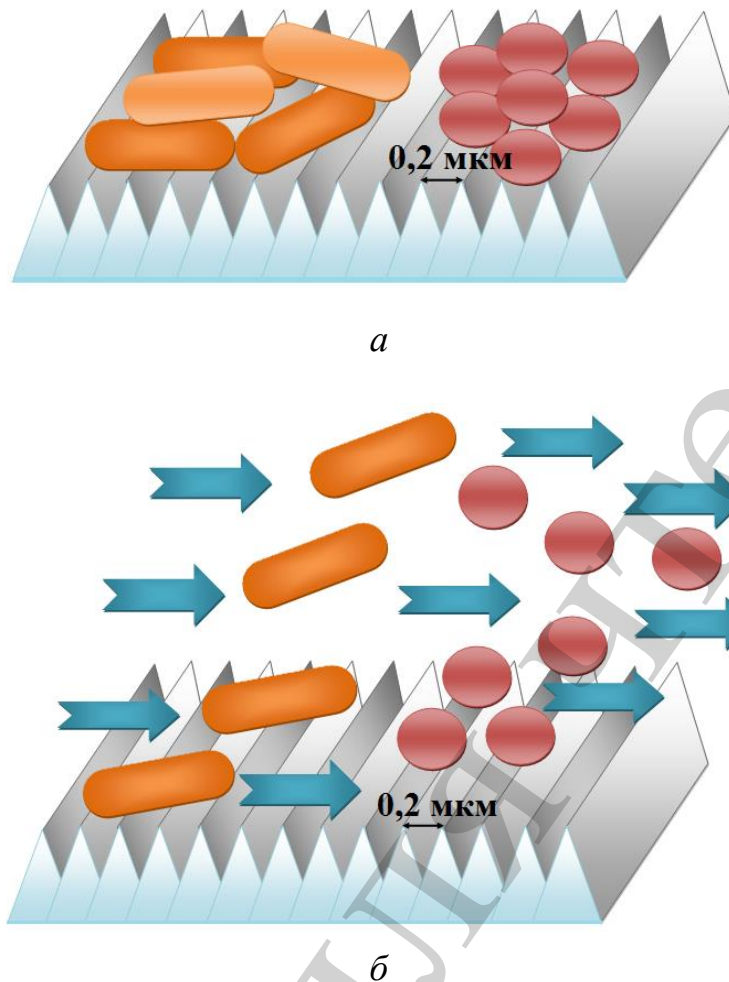


Рис. 10. Схематична модель формування і руйнування біоплівки паличковидними та коковими формами бактерій на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю 0,2 мкм: *а* – до санітарної обробки; *б* – під час санітарної обробки

6. Обговорення результатів досліджень формування і деградації біоплівки на поверхнях сталі з різною шорсткістю

Розвиток біоплівки на технологічному обладнанні створює серйозні проблеми на молокопереробних підприємствах завдяки контамінації молочних продуктів та зменшенню терміну їх придатності. Крім того, підвищується корозійність металевих поверхонь, знижується ефективність теплопередачі, підвищується стійкість до фрикції рідини під час санітарної обробки, що в цілому призводить до економічних втрат [17, 35, 36]. Частина дослідників вважають, що нержавіюча сталь з низькою шорсткістю поверхні проявляє кращі протиадгезивні властивості, внаслідок чого кількість прикріплених бактерій на ній значно менша, а відповідно санітарна обробка буде ефективніша [6, 17, 25]. Проведеними дослідженнями встановлено, що на поверхні нержавіючої сталі марки AISI 321 з шорсткістю $2,687 \pm 0,014$ мкм, процес плівкоутворення у *E. coli* та *S. aureus* проходив однаково упродовж з 3 до 24 год інкубації та не залежав від

розмірів і форми бактерій. На поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мкм процес плівкоутворення у *S. aureus* проходив інтенсивніше, ніж у *E. coli*. Упродовж перших 3 год інкубації оптична щільність сформованих біоплівки *S. aureus* була в 1,2 раза більша, порівняно з щільністю біоплівки сформованих *E. coli*. У наступні 15 годин інкубації сформовані біоплівки *S. aureus* були в середньому в 1,3 раза щільніші. З 18 по 24 год інкубації достовірної різниці між щільністю біоплівки утвореними *S. aureus* і *E. coli* не виявлено. Це дає підставу вважати, що *S. aureus* завдяки кулястій формі здатний розміщуватися у западинах шорсткості $0,95 \pm 0,092$ мкм і швидше адгезуватися до поверхні. Водночас *E. coli*, завдяки паличковидній формі, за такої шорсткості поверхні може адгезуватися у западини тільки повздовж і формувати біоплівки. Проте виявили, що інтенсивність процесу плівкоутворення у бактерій на поверхні з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мм, залежить від форми і розмірів бактерій тільки до 18 год інкубації. При використанні у дослідах нержавіючої сталі з шорсткістю менше 0,8 мкм, як це рекомендовано у харчовій промисловості згідно гігієнічних норм [4, 5], встановлено, що за шорсткості поверхні $0,63 \pm 0,087$ мкм інтенсивність плівкоутворення *S. aureus* була в середньому в 1,4 раза швидша, ніж у *E. coli*, до 18 год інкубації. Водночас, за шорсткості $0,16 \pm 0,018$ мкм процес плівкоутворення проходив однаково у *S. aureus* і *E. coli*, але сформовані біоплівки були нижчої щільності, порівняно з такими, які формувалися за шорсткості $0,63 \pm 0,087$ мкм. Отримані дані узгоджуються з дослідженнями [6], які вказують, що адгезія *L. monocytogenes* на нержавіючій сталі з шорсткістю нижче 0,8 мкм проходила повільніше, ніж на поверхні з шорсткістю 30 мкм. Проте встановлено, що крім шорсткості поверхні на процес формування біоплівки впливає форма і розмір клітин мікроорганізмів. Це пов'язано з тим, що за шорсткості 0,95 і 0,63 мкм кокові форми мікроорганізмів інтенсивніше формували біоплівки, ніж паличковидні. Підтримуємо думку вчених [7, 14], що це явище пов'язано із збільшенням площі контакту бактерій з поверхнею.

Тому вважаємо, що для ефективної санітарної обробки молочного обладнання максимальна шорсткість поверхні має становити – 0,5 мкм. Така обробка є оптимальним рішенням для попередження плівкоутворення, як коковими, так паличковидними формами бактерій.

Крім того, притримуємося думки, що на процес мікробної адгезії до поверхні, крім фізико-хімічних властивостей поверхні впливають такі клітинні структури мікроорганізмів, як джгутики, фімбрії, пілії та чинники навколишнього середовища, температура, рН, початкова кількість мікроорганізмів, час інкубації. Зазвичай після санітарної обробки поверхня і умови навколишнього середовища практично стабільні, тому виживання бактерій пов'язано із стійкістю до наявних дезінфікуючих засобів та здатністю до спороутворення.

Отже, підсумовуючи можна відзначити, що шорсткість поверхні та розміри бактерій відіграють ключову роль на початковій стадії формування біоплівки, тобто коли відбувається процес адгезії клітин мікроорганізмів до поверхні. За температури 25 °C інкубації *E. coli* та *S. aureus* на нержавіючій сталі з шорсткістю 0,95 і 0,63 мкм процес інтенсивного плівкоутворення залежав від розмі-

рів і форми бактерій до 18 год. У подальші години інкубації розміри бактерій на інтенсивність процесу формування біоплівки не впливають.

З практичної точки зору виявлені особливості інтенсивнішого процесу плівкоутворення коковими бактеріями на поверхні з меншою шорсткістю, ніж паличковидними, дозволяє визначення умов обробки поверхні сталі до зазначеної шорсткості, за якої процес адгезії сповільнений. Це дозволить обґрунтовано підходити до використання обладнання з визначеною шорсткістю поверхні та в подальшому отримати певні ефекти від впровадження у виробництво. Зокрема, за рахунок зменшення прикріплення мікроорганізмів до поверхні і зниження контамінації молочних продуктів.

Проте, на виробництві при монтажі обладнання не завжди надають значенню шорсткості поверхні, тривалості його експлуатації, впливу засобів санітарної обробки, які з часом руйнують рельєф поверхні. Тому перспективними аспектами розвитку подальших досліджень у даному напрямі є визначення впливу терміну експлуатації нержавіючої сталі з різною шорсткістю поверхні на мікробну адгезію і формування біоплівки, залежно від застосованих лужних і кислотних мийних дезінфікуючих засобів санітарної обробки.

Отже, для розроблення заходів із зменшенням адгезії і формування біоплівки на поверхнях нержавіючої сталі в молочній промисловості необхідно враховувати марку сталі, шорсткість поверхні, термін експлуатації обладнання, фізіологічні особливості мікрофлори, яка контамінує його та технологію санітарної обробки. Крім того, використання технологічного обладнання з шорсткістю менше 0,5 мкм дозволить знизити інтенсивність процесу плівкоутворення і покращить гігієнічну чистоту обладнання.

7. Висновки

1. Проведеними дослідженнями встановлено, що на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю $2,687 \pm 0,014$ мкм, процес плівкоутворення у *E. coli* та *S. aureus* проходив однаково упродовж з 3 до 24 години та не залежав від розмірів бактерій. Це дозволяє стверджувати, що паличковидні і кокові бактерії вільно прикріплюються у западинах шорсткості та формують біоплівки. Особливості формування біоплівки на поверхні сталі з шорсткістю $0,95 \pm 0,092$ мкм полягають у тому, що процес плівкоутворення у *S. aureus* проходив інтенсивніше, ніж у *E. coli*. Упродовж 3 год інкубації щільність сформованих біоплівки *S. aureus* була в 1,2 раза більша, порівняно з біоплівками *E. coli*. У наступні 15 годин інкубації сформовані біоплівки *S. aureus* були, в середньому в 1,3 раза щільніші. Це дає підставу вважати, що *S. aureus* завдяки кулястій формі здатний розміщуватися у западинах шорсткості $0,95 \pm 0,092$ мкм і швидше адгезуватися до поверхні. Водночас *E. coli*, завдяки паличковидній формі, за такої шорсткості поверхні може адгезуватися у западини тільки повздовж. Доведено, що за шорсткості поверхні $0,63 \pm 0,087$ мкм інтенсивність плівкоутворення *S. aureus* була в середньому в 1,4 раза швидша, ніж у *E. coli*. Водночас, за шорсткості $0,16 \pm 0,018$ мкм процес плівкоутворення проходив однаково у *S. aureus* і *E. coli*, але біоплівки були нижчої щільності, порівняно з такими, які формувалися за шорсткості $0,63 \pm 0,087$ мкм.

2. Теоретично змодельовано, що процес деградації біоплівки з нержавіючої сталі, під час санітарної обробки, найважче буде проходити за шорсткості поверхні 2,687–0,95 мкм. Це пов'язано з тим, що у западинах шорсткості можуть залишатися як кокові, так паличковидні бактерії, які сформовані у біоплівці. Водночас за шорсткості поверхні сталі 0,63–0,16 мкм утворені біоплівки менш захищені западинами шорсткості і процес деградації буде проходити швидше.

Отже, завдяки таким механізмам, що встановлено на основі теоретичних і експериментальних даних, можна стверджувати, що шорсткість поверхні та розміри бактерій відіграють ключову роль на початковій стадії формування біоплівки. Тому використання обладнання у молочній промисловості з шорсткістю не більше 0,5 мкм дозволить зменшення прикріплення мікроорганізмів до поверхні і зниження контамінації молочних продуктів.

Література

1. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them / Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O., Horyuk Y., Semaniuk N. // *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2017. Vol. 5, Issue 11 (89). P. 26–33. doi: <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488>
2. The influence of disinfectants on microbial biofilms of dairy equipment / Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O., Horyuk Y., Semaniuk N. // *EUREKA: Life Sciences*. 2017. Issue 5. P. 11–17. doi: <https://doi.org/10.21303/2504-5695.2017.00423>
3. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks / Shaheen R., Svensson B., Andersson M. A., Christiansson A., Salkinoja-Salonen M. // *Food Microbiology*. 2010. Vol. 27, Issue 3. P. 347–355. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.004>
4. Council directive 93/43/EEC on the hygiene of foodstuffs // *Official Journal of the European Communities*. 1993. No L 175/1.
5. Whitehead K. A., Verran J. The effect of surface properties and application method on the retention of *Pseudomonas aeruginosa* on uncoated and titanium-coated stainless steel // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2007. Vol. 60, Issue 2. P. 74–80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.11.009>
6. The retention of bacteria on hygienic surfaces presenting scratches of microbial dimensions / Verran J., Packer A., Kelly P., Whitehead K. A. // *Letters in Applied Microbiology*. 2010. Vol. 50, Issue 3. P. 258–263. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2009.02784.x>
7. Picosecond laser treatment production of hierarchical structured stainless steel to reduce bacterial fouling / Rajab F. H., Liauw C. M., Benson P. S., Li L., Whitehead K. A. // *Food and Bioprocess Processing*. 2018. Vol. 109. P. 29–40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.009>
8. Finkel J. S., Mitchell A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development // *Nature Reviews Microbiology*. 2011. Vol. 9, Issue 2. P. 109–118. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>

9. Monds R. D., O'Toole G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review // *Trends in Microbiology*. 2009. Vol. 17, Issue 2. P. 73–87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
10. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / Zhao K., Tseng B. S., Beckerman B., Jin F., Gibiansky M. L., Harrison J. J. et. al. // *Nature*. 2013. Vol. 497, Issue 7449. P. 388–391. doi: <https://doi.org/10.1038/nature12155>
11. Correction: Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition / Oliveira N. M., Martinez-Garcia E., Xavier J., Durham W. M., Kolter R., Kim W., Foster K. R. // *PLOS Biology*. 2015. Vol. 13, Issue 8. P. e1002232. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002232>
12. Monds R. D., O'Toole G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review // *Trends in Microbiology*. 2009. Vol. 17, Issue 2. P. 73–87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
13. Bacterial Adhesion and Biomaterial Surfaces / Moriarty T. F., Poulsen A. H. C., Rochford E. T. J., Richards R. G. // *Comprehensive Biomaterials*. 2011. P. 75–100. doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-055294-1.00007-6>
14. An overview of the influence of stainless-steel surface properties on bacterial adhesion / Hoevar M., Jenko M., Godec M., Drobne D. // *Materials and technology*. 2014. Vol. 48, Issue 5. P. 609–617.
15. Surface topographical factors influencing bacterial attachment / Crawford R. J., Webb H. K., Truong V. K., Hasan J., Ivanova E. P. // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2012. Vol. 179-182. P. 142–149. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.06.015>
16. Merritt K., An Y. H. Factors Influencing Bacterial Adhesion // *Handbook of Bacterial Adhesion*. 2000. P. 53–72. doi: <https://doi.org/10.1385/1-59259-224-4:53>
17. Impact of the surface roughness of AISI 316L stainless steel on biofilm adhesion in a seawater-cooled tubular heat exchanger-condenser / García S., Trueba A., Vega L. M., Madariaga E. // *Biofouling*. 2016. Vol. 32, Issue 10. P. 1185–1193. doi: <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1241875>
18. Effect of long-term operation on steels of main gas pipeline: Structural and mechanical degradation / Maruschak P., Panin S., Chausov M., Bishchak R., Polyvana U. // *Journal of King Saud University – Engineering Sciences*. 2018. Vol. 30, Issue 4. P. 363–367. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksues.2016.09.002>
19. Whitehead K. A., Verran J. The Effect of Substratum Properties on the Survival of Attached Microorganisms on Inert Surfaces // *Marine and Industrial Biofouling*. 2009. P. 13–33. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-69796-1_2
20. An Y. H., Dickinson R. B., Doyle R. J. Mechanisms of Bacterial Adhesion and Pathogenesis of Implant and Tissue Infections // *Handbook of Bacterial Adhesion*. 2000. P. 1–27. doi: <https://doi.org/10.1385/1-59259-224-4:1>
21. Partington E. *Stainless Steel in the Food & Beverage Industry* // *Materials and Applications*. 1-st ed. 2006. 24 p.
22. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry / Jullien C., Bénézech T., Carpentier B., Leb-

ret V., Faille C. // Journal of Food Engineering. 2003. Vol. 56, Issue 1. P. 77–87. doi: [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(02\)00150-4](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(02)00150-4)

23. Bacterial Adhesion and Surface Roughness for Different Clinical Techniques for Acrylic Polymethyl Methacrylate / Dantas L. C. de M., Silva-Neto J. P. da, Dantas T. S., Naves L. Z., das Neves F. D., da Mota A. S. // International Journal of Dentistry. 2016. Vol. 2016. P. 1–6. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/8685796>

24. Whitehead K. A., Benson P. S., Verran J. Developing application and detection methods for *Listeria monocytogenes* and fish extract on open surfaces in order to optimize cleaning protocols // Food and Bioproducts Processing. 2015. Vol. 93. P. 224–233. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.07.007>

25. Whitehead K. A., Verran J. The Effect of Surface Topography on the Retention of Microorganisms // Food and Bioproducts Processing. 2006. Vol. 84, Issue 4. P. 253–259. doi: <https://doi.org/10.1205/fbp06035>

26. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance / Hilbert L. R., Bagge-Ravn D., Kold J., Gram L. // International Biodeterioration & Biodegradation. 2003. Vol. 52, Issue 3. P. 175–185. doi: [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(03)00104-5)

27. Milledge J. J. The cleanability of stainless steel used as a food contact surface: an updated short review // Food Sci. Technol. 2010. Vol. 24, Issue 3. P. 18–20.

28. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity / Bos R., Mei H. C., Gold J., Busscher H. J. // FEMS Microbiology Letters. 2000. Vol. 189, Issue 2. P. 311–315. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09249.x>

29. Bacterial Retention on Superhydrophobic Titanium Surfaces Fabricated by Femtosecond Laser Ablation / Fadeeva E., Truong V. K., Stiesch M., Chichkov B. N., Crawford R. J., Wang J., Ivanova E. P. // Langmuir. 2011. Vol. 27, Issue 6. P. 3012–3019. doi: <https://doi.org/10.1021/la104607g>

30. Antibacterial Fluorinated Silica Colloid Superhydrophobic Surfaces / Privett B. J., Youn J., Hong S. A., Lee J., Han J., Shin J. H., Schoenfisch M. H. // Langmuir. 2011. Vol. 27, Issue 15. P. 9597–9601. doi: <https://doi.org/10.1021/la201801e>

31. Bioinspired Hierarchical Surface Structures with Tunable Wettability for Regulating Bacteria Adhesion / Dou X.-Q., Zhang D., Feng C., Jiang L. // ACS Nano. 2015. Vol. 9, Issue 11. P. 10664–10672. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b04231>

32. Femtosecond laser surface texturing of titanium as a method to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* and biofilm formation / Cunha A., Elie A.-M., Plawinski L., Serro A. P., Botelho do Rego A. M., Almeida A. et. al. // Applied Surface Science. 2016. Vol. 360. P. 485–493. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.10.102>

33. Study of the influence of Savinase® Evity 16L enzyme on biofilms formation of *staphylococcus aureus* on stainless steel with different roughness / Kukhtyn M., Kravcheniuk K., Beyko L., Horiuk Y., Skliar O., Kernychnyi S. // EUREKA: Life Sciences. 2019. Issue 2. P. 26–32. doi: <http://dx.doi.org/10.21303/2504-5695.2019.00858>

34. Bergey's manual of systematic bacteriology / P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg et. al. (Eds.) // The Firmicutes. Springer, 2009. doi: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>

35. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety / Marchand S., De Block J., De Jonghe V., Coorevits A., Heyndrickx M., Herman L. // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2012. Vol. 11, Issue 2. P. 133–147. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x>

36. Main microbiological and biological properties of microbial associations of "Lactomyces tibeticus" / Kukhtyn M., Vichko O., Berhilevych O., Horyuk Y., Horyuk V. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016. Vol. 7, Issue 6. P. 1266–1272.